

## 哺乳動物組織の種同定における遺伝子技術適用の試み

## A Molecular Method for Species Identification of Mammalian Tissues

八木 欣平 浦口 宏二 澤田 幸治

Kinpei YAGI, Kouji URAGUCHI and Yukiharu SAWADA

食品に異物として混入した生物組織片が、どのような生物種に属するのかをあきらかにすることや、また食肉として提供される野生動物（シカ、クジラなど）の種を同定することが、食品の安全性や公衆衛生上の面から強く求められている。これらの同定は、一般に哺乳類の分類に詳しい専門家により、形態の観察によって行われてきた。しかしながら、食肉として加工された状態などでは、同定に重要な形態が欠落していることが多く、種を決めることが不可能なことがある。我々は平成11年度より、寄生蠕虫の種を同定するために遺伝子工学技術を適用する試みを行ってきた<sup>1, 2)</sup>。そして寄生蠕虫の種の同定には、ある特定 DNA 領域の塩基配列が種によって異なることを利用し、PCRにより増幅した DNA の制限酵素切断パターンの比較と、増

幅 DNA の塩基配列の比較解析を組み合わせた方法が有効であることを報告してきた。今回はこの蠕虫類の同定に用いたプロセスを哺乳類の同定に適用することを考え、既に種が明らかにされている哺乳類（13属16種）の組織を用いて、種同定のための遺伝子工学的手法の有用性を検討したので報告する。

## 方 法

## 1. 材料

今回 DNA の抽出を行った組織検体を表 1 に示す。検体は主として筋肉組織で、DNA 抽出まで、冷凍もしくは70%エタノール溶液中に保存した。また一部血液をサンプルとして用いた。

表 1 哺乳類の12S rRNA 遺伝子の一部の塩基配列を増幅するプライマー URA12S-1/URA12S-2の有用性を検討するために用いた、種同定済みの哺乳類組織サンプル、増幅の結果、ならびにそれらの DNA データバンク情報との比較の結果

動物類	学名	サンプル	増幅サイズ(bp)	最も相同性の高い塩基配列を持った動物種	accession No.	相同性(%)
ddY マウス	<i>Mus musculus</i>	筋肉	331	<i>M. musculus</i>	AY012114	100
ミカドネズミ	<i>Clethrionomys rutilus mikado</i>	筋肉	328	<i>C. glareous</i> (ヨーロッパヤチネズミ)	J250356	97
ツチクジラ	<i>Berardius bairdii</i>	筋肉	347	<i>B. bairdii</i> *	AF334512	100
ミンククジラ	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	筋肉	350	<i>B. musculus</i> (シロナガスクジラ)	X72204	94
ヒツジ	<i>Ovis aries</i>	肝臓	335	<i>O. aries</i>	AF010406	100
ニホンジカ	<i>Cervus nippon</i>	筋肉	335	<i>C. unicolor</i> (サンバー)	M35875	99
ネコ	<i>Felis catus</i>	血液	331	<i>F. catus</i>	AY012149	100
キツネ	<i>Vulpes vulpes</i>	筋肉	335	<i>V. vulpes</i>	Y08508	100
ヒグマ	<i>Ursus arctus</i>	筋肉	331	<i>U. arctus</i>	Y08519	100
ノレンコウモリ	<i>Myotis nattereri</i>	筋肉	346	<i>M. myotis</i>	AF326098	91
ホオヒゲコウモリ	<i>Myotis mystacinus</i>	筋肉	341	<i>M. thysanodes</i>	AF326100	95
ヒメホオヒゲコウモリ	<i>Myotis ikonnikovi</i>	筋肉	341	<i>M. myotis</i>	AF326098	89
クマネズミ	<i>Rattus rattus</i>	筋肉	331	<i>E. rattus</i>	AJ005780	97
コトンラット	<i>Sigmodon hispidus</i>	筋肉	333	<i>S. hispidus</i> *	X89788	99
エゾヤチネズミ	<i>Clethrionomys rufocanus bedfordiae</i>	筋肉	328	<i>C. glareous</i> (ヨーロッパヤチネズミ)	J250356	96
スナネズミ	<i>Meriones unguiculatus</i>	血液	331	<i>Gerbillus nigeriae</i> *(アレチネズミ)	X84381	93

\*<sup>1</sup> 増幅した配列の一部のみ登録されているもの

## 2. 共通プライマーの設計

まず、増幅する遺伝子の領域は、回虫類の同定に有効であった ITS-2 及び、条虫、吸虫の同定に有効であったミトコンドリア 12S rRNA 遺伝子について検討した。すなわち、これらの領域について、DDBJ/EMBL/Gen Bank<sup>R</sup> に登録されている複数の哺乳類、両生類等のデータを集め、遺伝子解析ソフト GeneWorks<sup>R</sup> ver. 2.5 (IntelliGenetics, Inc.) を用いて塩基配列の比較解析を行い、共通プライマーの設計を試みた。ITS-2 領域では、ITS-2 を挟んで両側に位置している 5.8S と 28S の塩基配列を利用することによって、プライマー URAITS2-1 及び URAITS2-2 を設計する事ができた。URAITS2-1 は 5'-CATCGACACTTCGAACGCAC-3' で、URAITS2-2 は 5'-CTTAAATTCAGCGGGTCGCC-3' であった。また、ミトコンドリア 12S rRNA については、同様に比較的共通塩基配列がとりやすい領域を利用して URA12S-1 及び URA12S-2 を設計した。URA12S-1 は 5'-TCAGTCTATATACCGCCATC-3' で、URA12S-2 は 5'-GTATGCTTACCTTCTTACGAC-3' であった。

## 3. DNA 調製, PCR 及び塩基配列の決定

DNA の抽出, PCR 法による増幅, 塩基配列の決定は八木他<sup>1)</sup> に準じて行った。すなわち DNA の抽出は、組織の一部 (約 5 mm 角) から市販の DNA 抽出キット EASY-DNA<sup>TM</sup> isolation kit (Invitrogen) を用いて行った。また血液サンプルについては QIAamp スピンカラム (QIAGEN) を用いて行った。PCR 反応混合液は、10 mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% (w/v) ゼラチン, 0.2 mM の dNTP の混合液, それぞれ 10 pmol のプライマー, 1.25 単位の AmpliTaq Gold<sup>TM</sup> 耐熱性 Taq ポリメラーゼ (Perkin Elmer) 及び 1 µL の DNA 試料液で合計 50 µL になるように調製した。PCR は、両者とも同じ条件で行った。すなわち、95°C で 12 分間インキュベートした後、熱変性; 94°C, 0.5 分, アニーリング; 58°C, 0.5 分, 伸長反応; 72°C, 1 分の条件で 45 サイクル行った。PCR 産物 5 µL を 3% のアガロースゲル電気泳動に供して増幅 DNA の確認を行った。増幅 DNA が確認されたものについては、さらに 1.5% のアガロースゲルを用いて電気泳動し、増幅した DNA を抽出した後、ダイレクトシーケンス反応によってその塩基配列を決定した。すなわち、EASYTRA P<sup>TM</sup> (Takara) 抽出キットを用いてアガロースゲルから切り出し抽出・精製した DNA 断片を BigDye サイクルシーケンシング (Perkin Elmer Co.) 試料として、ABI-PRISM 310 DNA シーケンサー (Perkin Elmer Co.) により、DNA の塩基配列を決定した。得られた塩基配列の情報は、ホモロジー検索プログラム BLAST により DDBJ/EMBL/Gen Bank<sup>R</sup> に登録された塩基配列データと照合した。

## 結果及び考察

### 1. 実験動物の試料を用いた検討

設計した 2 種のプライマーセットによる PCR は、当研

究所で飼育している ddY マウス及びミカドネズミ *Clethrionomys rutilus mikado* の筋肉組織より抽出した total DNA を用いてを行った。その結果、図 1 のような増幅パターンが得られた。URAITS2-1 及び URAITS2-2 での増幅では複数のバンドが観察され、予測された約 870bp 付近には、明瞭なバンドを確認することが出来なかった。この PCR 反応に用いた AmpliTaq Gold<sup>TM</sup> 耐熱性 Taq ポリメラーゼは、プライマーが DNA の特異的部位に結合したときにのみ伸長反応を行う特性を持つ。従って、複数の増幅バンドが認められたことは、プライマーと相補的な塩基配列を成す領域が DNA に多く存在していることを示唆している。ITS2 領域を増幅するためにはさらに特異性の高いプライマーを設計する必要がある。一方 URA12S-1 及び URA12S-2 による増幅では、予測された約 330bp のサイズのバンドのみが明瞭に認められたことから、この増幅産物についてダイレクトシーケンシングを行った。これらの塩基配列のデータを DNA データバンクに登録された塩基配列と比較したところ、ddY マウスの増幅産物の塩基配列はハツカネズミ *Mus musculus* (accession number

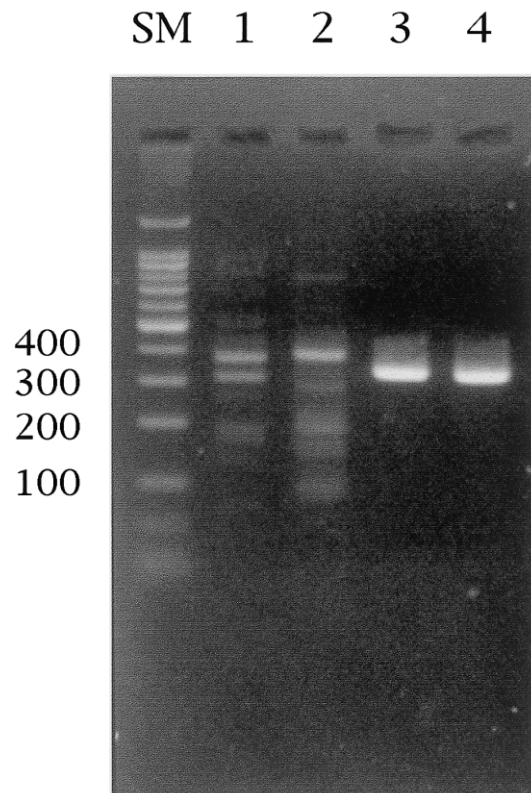


図 1 ddY マウスとミカドネズミの total DNA を鋳型として用いた URAITS2-1/URAITS2-2 プライマーならびに URA12S-1/URA12S-2 プライマーによる PCR 増幅

レーン 1, 2 ; URAITS2-1/URAITS2-2 プライマーによる増幅,  
レーン 3, 4 ; URA12S-1/URA12S-2 プライマーによる増幅,  
レーン 1, 3 ; ddY マウス, レーン 2, 4 ; ミカドネズミ  
SM ; サイズマーカー-100bp ladder (TAKARA)

Consensus	TTCAGCAAAC CCTAAAAAGG TATTAAAGTA AGCAAAAGAA TCAAACATAA	50
K409.Assemblage(ddY)	.....	50
Mus m AY012114	.....	50
Consensus	AAACGTTAGG TCAAGGTGTA GCCAATGAAA TGGGAAGAAA TGGGCTACAT	100
K409.Assemblage(ddY)	.....	100
Mus m AY012114	.....	100
Consensus	TTTCTTATAA AAGAACATTA CTATACCCTT TATGAAACTA AAGGACTAAG	150
K409.Assemblage(ddY)	.....	150
Mus m AY012114	.....	150
Consensus	GAGGATTTAG TAGTAAATTA AGAATAGAGA GCTTAATTGA ATTGAGCAAT	200
K409.Assemblage(ddY)	.....	200
Mus m AY012114	.....	200
Consensus	GAAGTACGCA CACACCGCCC GTCACCCTCC TCAAATTAAA TTAAACTTAA	250
K409.Assemblage(ddY)	.....	250
Mus m AY012114	.....	250
Consensus	CATAATTAAT TTCTAGACAT CCGTTTATGA GAGGAGATAA	290
K409.Assemblage(ddY)	.....	290
Mus m AY012114	.....	290

図2 URA12S-1/URA12S-2プライマーにより増幅された ddY マウスのミトコンドリア12S rRNA 遺伝子の部分配列（上段 K409. Assemblage (ddY)）と the DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide sequence databases に Accession No. AY012114 で登録されたハツカネズミ *Mus musculus* の同領域の遺伝子配列（下段 Mus m AY012114）とのアラインメント

Consensus	TTCAGCAAAC CCTAAAAAGG ARTAAAAGTA AGCAAGAGAA TCACCATAAA	50
K410.Assemblage(mikado)	.....G.....	50
Cl glareolus AJ250356	.....A.....	50
Consensus	AACGTTAGGT CAAGGTGTAG CCAATGTGGT GGAAGCAAT GGGCTACATT	100
K410.Assemblage(mikado)	.....	100
Cl glareolus AJ250356	.....	100
Consensus	TTCTTACYAA GAACATTACG CTACCCTTTA TGAAACTAAA GGACAAAGGR	150
K410.Assemblage(mikado)	.....T.....A	150
Cl glareolus AJ250356	.....C.....G	150
Consensus	GGATTTAGTA GTAAATTAAG AATAGAGWGC TTAATTGAAT WGAGCAATGA	200
K410.Assemblage(mikado)	.....T.....T.....	200
Cl glareolus AJ250356	.....A.....A.....	200
Consensus	AGTACGCACA CACCGCCCGT CACCCTCCTC AACTAAATA AACGAAACYT	250
K410.Assemblage(mikado)	.....C.....	250
Cl glareolus AJ250356	.....T.....	250
Consensus	ATACATAATT RCATCAARCT TTTACGAGAG GAGATAA	287
K410.Assemblage(mikado)	.....A.....G.....	287
Cl glareolus AJ250356	.....G.....A.....	287

図3 URA12S-1/URA12S-2プライマーにより増幅されたミカドネズミ *Clethrionomys rutilus mikado* のミトコンドリア 12S rRNA 遺伝子の部分配列（上段 K410. Assemblage (mikado)）と the DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide sequence databases に Accession No. AJ250356 で登録されたヨーロッパヤチネズミ *C. glareolus* の同領域の遺伝子配列（下段 Cl glareolus AJ250356）とのアラインメント

AY012114) の12S rRNA 領域と完全に一致し、ミカドネズミについては、ヨーロッパヤチネズミ *Clethrionomys glareous* (accession number J250356) の同領域と最も高い相同性 identities (97%) が認められた (図 2, 3)。

## 2. 各種試料を用いた検討

実験動物の試料の結果から、ITS2領域の増幅は、さらに PCR 条件やプライマーの再検討が必要と考えられたので、今回はミトコンドリア12S rRNA 領域の増幅についてのみ検討を行った。その結果、検討した12属14種の哺乳類のいずれの試料についても、約330-350bp 付近に明瞭なバンドが確認された。それぞれ得られた DNA の塩基配列は ddY マウス及びミカドネズミと同様に BLAST サーチを行い、登録されている中で最も相同性の高い塩基配列の情報を入手した。それぞれのサンプルと最も相同性が高い塩基配列を持つ哺乳類の種、その accession number 及び相同性を表 1 に示した。今回解析した DNA の塩基配列は、全て哺乳類の12S rRNA の中に見出された。表 1 に示したように、同種内では高い相同性が認められ、別種間の相同性は低かった。12S rRNA 領域の塩基配列には、種の間で明確な違いが認められ、分類学上比較的近縁と考えられるミカドネズミとエゾヤチネズミ *C. rufocanus bedfordiae* においても98%の相同性、すなわち287塩基のうち7塩基での差異が認められた。

哺乳類の遺伝子解析は、進化系統樹の作製や集団内の遺伝子の多様性などの研究を目的に、これまで多くの報告がある。しかしながら、種を決めるために遺伝子 DNA の塩基配列を利用するという視点での報告はない。その理由としては、哺乳類の種が一般に形態的に容易に判別できるこ

と、塩基配列の決定のための DNA 調製技術や解析コストがかかること等があげられる。しかしながら上述のように、食品に混入したネズミ類の同定や、加工されて市場に出る獣肉の様な形態的特徴からの種の同定が容易でない場合には、遺伝子 DNA の塩基配列を用いた種の同定法が極めて有効であろう。今回、我々の設計したミトコンドリア12S rRNA 領域を増幅するための共通プライマー URA12S-1及び URA12S-2がこの目的にとって優れたプライマーで、この領域の塩基配列の決定と DNA データベースとの照合が、種を判断する上で有用であることを示した。最近、DNA 塩基配列の決定がシーケンサーの改良などで、容易になったことから、哺乳類においても寄生蠕虫の種の同定と同様、遺伝子解析による同定法を有効に活用すべきと考える。

本調査研究は平成13年度遺伝子工学の基礎技術導入に関する特別研究「寄生虫や衛生動物等の種の同定のための遺伝子技術の開発」の一環として行われたことを付記し、ご協力いただいた関係諸氏、特に貴重な標本を提供していただいた、根室市博物館開設準備室学芸員 近藤憲久氏、北海道環境科学研究センター自然環境部野生動物科 間野勉科長、当研究所生物科学部衛生動物科 高橋健一科長、感染病理科 伊東拓也研究職員、食品薬品部食品保健科 長南隆夫科長に深謝します。

## 文 献

- 1) 八木欣平, 浅川満彦, 大山 徹, 岡本宗裕: 道衛研所報, 49, 159 (1999)
- 2) 八木欣平, 浦口宏二, 高橋健一, 宮西浩嗣: 道衛研所報, 51, 68 (2001)

